



TITLE:

Studies on sustainable technologies for utilization and preservation of marine resources: ethanol production from macroalgae and protection of reef-building corals from environmental stresses(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Motone, Keisuke

CITATION:

Motone, Keisuke. Studies on sustainable technologies for utilization and preservation of marine resources: ethanol production from macroalgae and protection of reef-building corals from environmental stresses. 京都大学, 2020, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22513>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	元根 啓佑
論文題目	Studies on sustainable technologies for utilization and preservation of marine resources: ethanol production from macroalgae and protection of reef-building corals from environmental stresses （大型藻類を用いたエタノール生産と造礁サンゴの環境ストレスからの保護を目的とした海洋資源の利用・保全技術に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
<p>広大な排他的経済水域を有する日本において、海洋資源の保全および有効利用が求められている。海藻の一種である褐藻類は、食料と競合せず、難分解性物質リグニンを含まないことから、次世代型バイオマスとして注目を集めている。しかし、褐藻類の貯蔵多糖ラミナリン（β-1,6-結合の枝分かれ構造を持つβ-1,3-グルカン）は、褐藻類の乾燥重量の最大35%を占めるにもかかわらず、分解技術が開発されてこなかったため有効利用されていない。また、沖縄海域には世界で有数の豊かなサンゴ礁が広がっており、海洋生物の宝庫になっているが、海水温上昇等の影響により造礁サンゴの個体数が急速に減少していることが問題になっている。造礁サンゴの死滅は、サンゴ礁に生息する多種多様な生物の消滅にもつながるため、早急な対策が求められている。</p> <p>本論文では、海洋資源の有効利用という観点から、褐藻類の主成分ラミナリンからエタノールを直接生産できる酵母株を創出した。また、海洋資源の保全という観点から、造礁サンゴを環境ストレスから保護する技術の開発を目的として研究を行った。</p>			
1. 褐藻類の貯蔵多糖ラミナリンからのエタノール生産			
<p>強力な多糖分解能力を持つ海洋細菌<i>Saccharophagus degradans</i>をラミナリン培地とグルコース培地でそれぞれ培養し、比較プロテオーム解析を行ったところ、ラミナリン培地特異的に生産されるタンパク質を92種類同定した。その中には糖加水分解酵素ファミリー5に属する機能未知の酵素Gly5Mが存在したため、Gly5Mをラミナリン分解酵素の候補として選抜した。次に、Gly5Mの遺伝子を酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>の細胞壁アンカータンパク質であるα-アグルチニンの遺伝子と融合して細胞表層に発現させることにより、Gly5M提示酵母を作製した。Gly5M提示酵母をラミナリンと反応させたところ、オリゴ糖が生成したことから、Gly5Mは新規のラミナリン分解酵素であることが確認できた。また、生成したオリゴ糖を分析した結果、その大部分はグルコースがβ-1,6-結合した二糖であるゲンチオビオースであることが判明した。そこで、ゲンチオビオースを分解する<i>Aspergillus aculeatus</i>由来のβ-グルコシダーゼ（BG）提示酵母を作製し、Gly5M提示酵母とBG提示酵母をラミナリン培地を用いて共培養をしたところ、20 g/Lのラミナリンから5.2 g/L（理論最大収率の46%）のエタノール生産に成功した。</p>			
2. 熱ストレスからのサンゴ幼生の保護			
<p>海洋資源を持続可能な形で有効利用するためには、海洋資源の保全も必要となってくる。本研究では、多種多様な海洋資源の生息を支えているサンゴ礁に着目し、活性酸素種の消去能を持つRedox nanoparticle（RNP）を用いて、高温条件下で飼育したサンゴ幼生の生存率を向上させることを目的とした。RNPは、抗活性酸素剤であるニトロキシドラジカルが中分子量ポリマーに共有結合した構造をとっており、水中で自己組織化して比較的大きな粒子（直径約40 nm）を形成する。そのため、正常な細胞膜を透過しにくく、傷害を受けた細胞選択的に作用するという特徴を有する。</p>			

33°Cの高温条件で飼育したウスエダミドリイシの幼生に対してRNPを投与したところ、10日後生存率は63.3%であった。一方で、RNP未投与群では10日後生存率は0%であった。また、活性酸素種の産生に応答するタンパク質群の生産がRNPの投与により減少していることをプロテオーム解析により明らかにした。これらの結果から、RNPが過剰な活性酸素種を消去することで、高温ストレス下におけるサンゴ幼生の生存率の向上に寄与していることが示唆された。

3. 共生細菌による褐虫藻のストレス耐性の向上

サンゴ細胞内に共生している褐虫藻をサンゴが失うことで白くなる「白化現象」は、サンゴの死滅の主要な要因となっている。サンゴの白化は、褐虫藻が熱ストレスや光ストレスを受けることで、褐虫藻の光化学系が機能不全に陥り、活性酸素種が過剰に産生されることで誘導されると考えられている。そのため本研究では、褐虫藻のストレス耐性を向上させることを目的として、褐虫藻の共生細菌が褐虫藻のストレス耐性に与える影響を調べた。

造礁サンゴの一種であるアザミサンゴから単離した褐虫藻の細菌叢解析を行ったところ、褐虫藻にはフラボバクテリアとアルファプロテオバクテリアに属する細菌が主に共生していることが分かった。この褐虫藻を抗生物質で処理したところ、フラボバクテリアの相対存在量が減少した。また、褐虫藻を熱ストレスおよび光ストレス条件下で培養し、光化学系IIの最大量子収率および活性酸素種の生産量を測定したところ、抗生物質処理を行った褐虫藻では、光化学系IIの最大量子収率が有意に減少し、活性酸素種の生産量が有意に上昇していた。さらに、褐虫藻に共生していたフラボバクテリアの単離株（GF1株と命名）の取得を行い、抗生物質処理を行った褐虫藻に対してGF1株の接種を行ったところ、抗生物質未処理の褐虫藻と同程度まで光化学系IIの最大量子収率および活性酸素種の生産量が改善することを明らかにした。

次に、GF1株が褐虫藻のストレス耐性の向上に寄与するメカニズムを明らかにするため、GF1株のゲノム解析を行った。その結果、GF1株はカロテノイドの一種であるゼアキサントンの生合成経路を有していることが明らかになった。また、LC-MS/MSによる代謝物分析を行い、GF1株がゼアキサントンを生産していることを代謝物レベルでも実証した。ゼアキサントンは天然の抗酸化剤であり、活性酸素種の消去能を有するため、GF1株がゼアキサントンを生産することで褐虫藻のストレス耐性の向上に寄与していることが予測された。そこで、熱ストレスおよび光ストレス条件下で培養した褐虫藻に対してゼアキサントンの投与実験を行ったところ、光化学系IIの最大量子収率が有意に上昇し、活性酸素種の生産量が有意に減少することが分かった。以上の結果から、GF1株はゼアキサントンの生産を通して褐虫藻のストレス耐性の向上に寄与していることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

地球の総面積に占める海洋の割合は約7割であり、海洋資源の持続可能な有効利用および保全は世界規模で重要な課題である。本研究では、海洋細菌の比較プロテオーム解析と酵母細胞表層工学を用いることで、これまで有効利用されてこなかった大型藻類の糖成分からエタノールを直接生産する技術を開発した。また、地球温暖化に伴い世界規模で絶滅の危機に瀕している造礁サンゴを環境ストレスから保護する技術を開発した。成果として評価すべき点は以下の3点である。

1. 海洋細菌 *S. degradans* のプロテオーム解析によって、新規のラミナリン分解酵素Gly5Mを同定した。また、作製したGly5M細胞表層提示酵母を用いてラミナリンをゲンチオビオースまで分解することに成功した。さらに、Gly5M提示酵母とゲンチオビオースを分解するBG提示酵母の共培養を行うことで、20 g/L のラミナリンから5.2 g/L (理論最大収率の46%) のエタノール生産に成功した。

2. 高温条件下で飼育したサンゴ幼生に対してナノ粒子RNPを投与したところ、生存率の向上が認められた。また、プロテオーム解析によって、RNPの投与により活性酸素種の産生に応答するタンパク質群の生産が減少することを明らかにした。これらの結果から、RNPが高温ストレス下で過剰に産生された活性酸素種を消去することで、サンゴ幼生の生存率の向上に寄与していることを明らかにした。

3. サンゴに細胞内共生する褐虫藻のストレス耐性を向上させるフラボバクテリアに分類される細菌GF1株を単離し、褐虫藻に接種することでその効果を確かめた。また、GF1株がゼアキサンチンを生産していることを明らかにした。ゼアキサンチンを褐虫藻に対して投与したところ、褐虫藻においてストレスレベルの軽減が認められたことから、GF1株はゼアキサンチンの生産を通して褐虫藻のストレス耐性の向上に寄与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、これまで未知であった海洋細菌のラミナリン分解機構を解明し、その情報をもとにラミナリン資化能を有する酵母の作製に成功した。また、環境ストレスから造礁サンゴおよび褐虫藻を防御する効果のある物質を発見しており、地球規模での海洋資源の有効利用および保全への貢献が期待できる。これらの結果は、生体高分子化学、バイオマス変換学、海洋生態学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)